

DE 99/2871



9/786 926

| | |
|-------------------|-----|
| REC'D 02 DEC 1999 | |
| WIPO | PCT |

ESU

Bescheinigung

Die Anmelderin Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

„G-Protein gekoppelter Rezeptor EDG6 und seine Verwendung“

am 11. September 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 07 K und A 61 K der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 19. November 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Wahner

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Aktenzeichen: 198 43 240.2

11.09.99

1



Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin

M. Gräler, G. Bernhardt, M. Lipp

G-Protein gekoppelter Rezeptor EDG6 und seine Verwendung

Beschreibung

Die Erfindung betrifft den G-Protein gekoppelten Rezeptor EDG6 und seine Fragmente, Varianten und Mutationen sowie seine Verwendung. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Molekularbiologie, die Pharmazie und die Medizin.

Die Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPRs) umfaßt mehrere hundert Proteine. Ihre prinzipielle Aufgabe im Organismus besteht darin, Informationen von der extrazellulären Umgebung in das Zellinnere durch Interaktion mit heterotrimeren Guaninnukleotid-bindenden Proteinen, die gemeinhin als G-Proteine bezeichnet werden, weiterzuleiten (Dohlman et al., 1987). Dadurch nehmen sie Einfluß auf die regulatorischen Prozesse innerhalb von Zellen (Böhm et al., 1997).

Die große Zahl der GPRs spiegelt sich auch in einer großen Mannigfaltigkeit von extrazellulären Liganden, der sogenannten 'first messenger', wieder. Es sind GPRs für Hormone und Neurotransmitter bekannt, für parakrine Substanzen und inflammatorische Mediatoren, für bestimmte Proteasen, für eine große Anzahl von Geschmacks- und Geruchsmolekülen sowie für Photonen und Calciumionen (Watson und Arkinstall, 1994).

Die EDG (endothelial differentiation gene) Rezeptorfamilie gehört zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPRs). Das erste Mitglied dieser Familie, EDG1, wurde 1990 im Rahmen einer Untersuchung der nichtproliferativen Aspekte der Angiogenese bei der Organisation und Differenzierung von Endothelzellen in Kapillare kloniert.

Ein weiteres Mitglied der EDG-Rezeptorfamilie, EDG2, kommt vor allem in cortikalen neurogenen Regionen vor.

Die cDNA eines dritten Mitglieds der EDG-Rezeptorfamilie wurde aus humaner Placenta, Niere und Leber sowie aus humanem Herz isoliert und auf Chromosom 9q22.1-2 lokalisiert. Humane EDG4 cDNA Transkripte wurden kürzlich aus Hoden, Prostata, Pankreas und peripheren Blutleukozyten sowie in geringerem Umfang in Thymus und Milz nachgewiesen. Zwei weitere Transkripte wurden aus glatten Muskelzellen der Ratten-Aorta bzw. aus murinen und bovinen Geschmacksknospen isoliert. Als möglicher Ligand für den humanen und den murinen EDG2 Rezeptor sowie für den humanen EDG4 Rezeptor wurde Lysophosphatidylsäure (LPA; 1-Acyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphat) ausgemacht. Ferner sind für die humanen Rezeptoren EDG1 und EDG3 sowie für den H218 Rezeptor der Ratte Lysosphingolipide als funktionelle Liganden gefunden worden.

A Der Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, ein weiteres Mitglied der EDG-Rezeptorfamilie zu isolieren, zu identifizieren und für eine medizinische Anwendung nutzbar zu machen.

Es wurde gefunden, daß *in vitro* differenzierte dendritische Zellen einen weiteren EDG-Rezeptor exprimieren, der als EDG6 bezeichnet wird.

Der humane EDG6 Rezeptor umfaßt 384 Aminosäuren der Sequenz 1 mit sieben Transmembrandomänen. Der Rezeptor besitzt eine mögliche N-terminale Glykosylierungsstelle, drei mögliche Palmitoylierungsstellen 12 bis 15 Aminosäuren C-terminal von der siebten Transmembrandomäne gelegen sowie vier mögliche C-terminale Proteinkinase C-Phosphorylierungsstellen. Ein Modell des Rezeptors ist in Abbildung 1 dargestellt.

Der EDG6 Rezeptor ist das erste Mitglied der EDG-Familie, das aus *in vitro* differenzierten humanen dendritischen Zellen isoliert werden konnte. Er zeigt in der Northernblot-Analyse ein Signal bei etwa 1,7 kb. Humane *edg6* mRNA wird in den

Burkitt-Lymphom-Zelllinien JBL2, BL64 und DG75, in der promyelozytischen Zelllinie U937 und in der T-Zelllinie CEM exprimiert. Hohe gewebsspezifische Expressionsraten von humanem *edg6* wurden in humaner adulter und fötaler Milz sowie in adulten peripheren Leukozyten und der Lunge gefunden. Geringere Expressionsraten von humanem *edg6* wurden in adultem Thymus, Lymphknoten, Knochenmark und Blinddarm sowie in fötaler Leber, Thymus und Lunge detektiert.

Zum Umfang der Erfindung gehört auch die cDNA-Sequenz des EDG6 Rezeptors mit der Sequenz 2.

Bei der Suche nach homologen Sequenzen zur Sequenz 2 in der Nukleinsäuredatenbank mit Hilfe des Programms BLASTN aus dem Husar-Paket des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg konnte ein muriner Klon identifiziert werden, der hohe Homologien zum neu identifizierten EDG6 Rezeptor aufweist. Der murine cDNA-Klon aus der EST (expressed-sequence tag) Nukleinsäuredatenbank stammt aus Lymphknoten und ist auf Aminosäureebene nach einer Korrektur des Datenbankeintrags, der zu einer Veränderung des Leserahmens führt, über 106 Aminosäuren zu 88 % homolog zum humanen EDG6 Rezeptor. Daraus folgt, daß dieser cDNA-Klon ein Fragment des murinen Homologs zum humanen EDG6 Rezeptor ist.

Ausgehend von diesem partiellen Klon wurde mit Hilfe einer speziellen Polymerase-Kettenreaktion die gesamte murine cDNA-Sequenz (Sequenz 3) ermittelt.

Das aus dieser cDNA-Sequenz abgeleitete Protein hat die Sequenz 4.

Ferner werden auch auch spezifische anti-EDG-6-Antikörper beansprucht. Sie werden hergestellt, indem Ratten mit einem GST-Fusionsprotein immunisiert werden, das ein Fragment des EDG6 Rezeptors enthält. Mit Hilfe der Milzzellen der Ratte werden Hybridome hergestellt, die mittels ELISA-Analyse auf die Produktion von spezifischen Antikörpern hin untersucht werden.

Weitere Möglichkeiten zur Gewinnung von Antikörpern sind die Immunisierung mit ganzen Zellen, die den Rezeptor EDG6 nach Einbringung der cDNA oder bereits natürlicherweise exprimieren, sowie mit einem C-terminal 6 x Histidin-gekoppelten N-terminalen EDG6-Fragment.

Im weiteren Ausbau der Erfindung werden EDG6-defiziente Mäuse hergestellt, d.h. Mäuse, die funktionslose Mutanten ('Nullmutante') des EDG6 enthalten. Diese knock out-Mäuse dienen als Tiermodell für Krankheiten, die möglicherweise mit dem EDG6 Rezeptor in Verbindung stehen. Die Charakterisierung des Phänotyps dieser Mäuse kann entscheidend zur Funktionsbestimmung beitragen. Dazu wird ein funktionsloses *edg6* Gen mit entsprechenden Selektionsmarkern mit Hilfe der homologen Rekombination in das Genom von murinen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) integriert. Die selektionierten ES-Zellen werden anschließend als multipotente Zellen in murine Embryonen der frühen Zellentwicklung (Morula, Blastozyste) eingesetzt.

Mit diesen Mäusestämmen können weitere Aussagen über die Funktion des EDG6-Rezeptors gemacht werden, z. B. können Erkrankungen festgestellt werden, die direkt oder indirekt durch den EDG6-Rezeptor verursacht oder in ihrem Ausmaß verstärkt werden. Insbesondere zählen dazu Immunschwächen, beispielsweise gegenüber Infektionen, sowie Erkrankungen, die auf akuten und chronischen Entzündungen beruhen. Weiterhin zählen dazu Autoimmunerkrankungen, Allergien und maligne Erkrankungen, wie Tumore, Leukämien und Lymphome. Aufgrund der hohen Homologie des murinen Rezeptors mit dem humanen Rezeptor, sowie aufgrund des hoch konservierten gewebsspezifischen Expressionsmusters können die Ergebnisse des Mausmodells weitgehend auf den Menschen übertragen werden. Der erfindungsgemäße humane Rezeptor EDG6 kann direkt oder indirekt an dem Auftreten von Immunschwächen, akuten und chronischen Entzündungen, Autoimmunerkrankungen, Allergien und malignen Erkrankungen beteiligt sein oder deren Schwere und Ausmaß verstärken.

Des weiteren betrifft die Erfindung auch die Verwendung der EDG6-Nukleinsäuren und EDG6-Polypeptide in ursprünglicher, modifizierter oder synthetischer Form als Ausgangsbasis zur Entwicklung von pharmazeutisch relevanten Substanzen. Die EDG6-Nukleinsäuren werden dabei zum Aufbau von Genen und Vektoren, und die EDG6-Polypeptide zum Aufbau von Elisa-Verfahren, Durchmessungs- und Testverfahren eingesetzt. Die pharmazeutisch relevanten Substanzen binden entweder selbst an das Rezeptorpolypeptid oder die Rezeptor-kodierende Nukleinsäure oder sie beeinflussen die Bindung des physiologischen Liganden oder die Bindung und Aktivität intrazellulärer nachgeschalteter Signalmoleküle und führen dadurch zu einer Aktivierung oder Hemmung der Rezeptorfunktion. Diese Substanzen mit agonistischer oder antagonistischer Wirkung auf die Funktion des EDG6-Rezeptors können organische Moleküle, anorganische Moleküle und Peptide oder Kombinationen aus diesen Substanzklassen sein.

Die Erfindung ermöglicht einen medizinischen Einsatz für folgende diagnostische oder therapeutische Maßnahmen.

1. Bei Krankheiten, die durch normabweichende Expression oder durch Rezeptormutationen hervorgerufen werden, kann eine Diagnostik, zum Beispiel mit Testkits auf der Basis von monoklonalen Antikörpern oder Nukleinsäurenachweisverfahren, erfolgen.
2. Bei Krankheiten, die mit der Rezeptorfunktion in Zusammenhang stehen, können die Funktionen des Rezeptors in agonistischer oder antagonistischer Weise beeinflusst werden.
3. Der EDG6-Rezeptor in ursprünglicher oder modifizierter Form sowie spezifische Antikörper oder Bindungspartner können für therapeutische Zwecke, beispielsweise für gentherapeutische Verfahren (beispielsweise auf zellulärer, liposomaler oder viraler Basis) eingesetzt werden, wenn eine Fehlfunktion des Rezeptors oder fehlerhafte Expression des EDG6-Rezeptors oder dessen Liganden vorliegt.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

Ergebnisse

Zur Bestimmung von neuen Chemokinrezeptoren und verwandten Rezeptoren, die in den regulatorischen Abläufen des Immunsystems involviert sind, wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit degenerierten Primern angewendet, um G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) aus in vitro differenzierten humanen dendritischen Zellen zu identifizieren. Humane periphere mononukleäre Blutzellen wurden durch Behandlung mit den Cytokinen GM-CSF und IL-4 zu dendritischen Zellen ausdifferenziert. Die PCR mit degenerierten Primern aus Bereichen der zweiten und der siebten Transmembrandomäne (TM) einiger Chemokinrezeptoren führte zur Identifizierung eines 648 bp Fragments, welches Teil eines neuen Mitglieds der GPCR Superfamilie ist. Die mögliche 1560 bp umfassende Vollängen-cDNA wurde schrittweise mittels 5'- und 3'-RACE-PCR kloniert. Die cDNA enthält einen offenen Leserahmen von 1155 bp, eine 22 bp große 5'-nichttranslatierte Region sowie eine 383 bp große 3'-nichttranslatierte Region. Möglicherweise ist die cDNA am 3'-Ende jedoch nicht vollständig, da sie kein typisches Polyadenylierungssignal aufweist. Sequenz 1 zeigt die resultierende Aminosäuresequenz. Sequenzvergleiche deuten daraufhin, daß der neu identifizierte Rezeptor zur EDG Familie der GPCRs gehört. Daher wurde er EDG6 genannt. Der Vergleich der Aminosäuresequenz von EDG6 mit den anderen EDG-Rezeptormolekülen von der ersten bis zur siebten Transmembrandomäne zeigt, daß EDG6 46% Identität zu EDG3, 44% zu EDG1, 39% zu EDG4 und 37% zu EDG2 hat. Der nächste verwandte GPCR ist hCB1R, ein Mitglied der Cannabinoid Rezeptorfamilie, mit 31% Identität. Durch computergestützte Analysen konnten die mögliche Lokalisation der sieben Transmembrandomänen, eine mögliche N-Glykosylierungsstelle in der N-terminalen extrazellulären Region sowie mehrere posttranslationale Modifikationsstellen in der C-terminalen zytoplasmatischen Domäne bestimmt werden. Ferner wurde die korrekte Orientierung

des Moleküls in der Zellmembran mit dem N-Terminus auf der extrazellulären Seite näher untersucht. Hierzu wurde die Protein kodierende cDNA-Sequenz unter Erhaltung des Leserahmens in einen eukaryontischen Expressionsvektor kloniert, der C-terminal der einklonierten Sequenz ein *myc*-Epitop exprimiert. Nach Transfektion dieses Vektors in die humane embryonale Nierenzelllinie HEK 293 konnte das Fusionsmolekül durch einen anti-*myc* spezifischen monoklonalen Antikörper mittels Durchflußzytometrie lediglich in permeabilisierten Zellen nachgewiesen werden. Desweiteren sind die letzten 50 bp der humanen *edg6* (*hedg6*) cDNA identisch mit den Basenpaaren 13 bis 62 einer kurzen Sequenz, die den repetitiven Dinukleotid-Polymorphismus D19S120 enthält. Dieser Polymorphismus wurde auf Chromosom 19p13.3 lokalisiert. Durch eine PCR mit genspezifischen Primern von *hedg6* cDNA und dem D19S120 Amplicon konnte ein humanes genomisches DNA-Fragment amplifiziert werden, das das 3'-Ende von *hedg6* und den D19S120 Polymorphismus enthält. Damit ist gezeigt, daß *hedg6* auf Chromosom 19p13.3 neben dem D19S120 Marker lokalisiert ist.

Ferner konnte das murine Homolog der *edg6* (*medg6*) cDNA mit Hilfe der RACE-PCR isoliert werden. Hierfür wurde gesamt-RNA der aus muriner fötaler Haut stammenden dendritischen Zelllinie 18 verwendet. Es wurden genspezifische Primer hergestellt, die aus der murinen EST-Sequenz des cDNA-Klons val6c04.r1 (GenBank Eintrag Nr. AA254425) stammen und eine hohe Identität zum 3'-Ende der kodierenden Region der *hedg6* cDNA aufweisen. Die Primer wurden so gewählt, daß der offene Leserahmen von *medg6* amplifiziert werden konnte. Daher ist die *medg6* cDNA am 3'-Ende unvollständig. Sie enthält einen offenen Leserahmen von 1161 bp. Die ersten 99 bp der 499 bp umfassenden 5'-nichttranslatierten Region enthalten ein murines repetitives Element B1. Der offene Leserahmen der *medg6* cDNA ist zu 80% homolog zur entsprechenden humanen Sequenz. Auf Proteinebene haben beide Sequenzen eine Identität von 82% und eine Ähnlichkeit von 91%. Die möglichen posttranslationalen Modifikationsstellen sind sowohl in der humanen, als auch in der murinen *edg6*-Sequenz konserviert.

Als nächstes wurde das Expressionsmuster von *edg6* untersucht. Hierfür wurden DNA-Fragmente hergestellt, die in der murinen und in der humanen cDNA-Sequenz Regionen mit geringer Konservierung repräsentieren. Diese Fragmente wurden dann als radioaktiv markierte Sonden in Northernblots eingesetzt. In humanen Zelllinien wurde ein *hedg6* spezifisches Signal bei etwa 1,7 kb gefunden. *hedg6* mRNA wird in den Burkitt-Lymphom-Zelllinien JBL2, BL64 und DG75, in der promyelozytischen Zelllinie U937 und in der T-Zelllinie CEM exprimiert, während sie in der Kehlkopfkrebs-Zelllinie HEP2 und dem HEP2 Subklon cl32 sowie in der Cervix-Karzinom-Zelllinie HeLa nicht nachgewiesen werden konnte. Generell wird *hedg6* in allen getesteten positiven Zelllinien schwach exprimiert und ist nur durch verlängerte Expositionszeiten der Blots nachzuweisen. Aufgrund der hohen Spezifität der Hybridisierungsproben war es möglich, die gewebsspezifische Expression von *hedg6* mit mRNA-Proben aus 50 unterschiedlichen humanen Geweben mittels eines Dot-Blots zu bestimmen. Hohe Expressionsraten von *hedg6* wurden in humaner adulter und fötaler Milz sowie in adulten peripheren Leukozyten und der Lunge gefunden. Geringere Expressionsraten von *hedg6* wurden in adultem Thymus, Lymphknoten, Knochenmark und Blinddarm sowie in fötaler Leber, Thymus und Lunge detektiert.

Die gewebsspezifische Expression von *medg6* mRNA stimmt im Rahmen der untersuchten Organe sehr gut mit dem humanen Expressionsmuster überein. Hybridisierungssignale wurden in muriner Lunge, Milz, Thymus und Lymphknoten gefunden, während sie in nichtlymphatischem Gewebe ausblieben. Die murine *edg6* mRNA ist etwa 2,1 kb groß und damit 0,4 kb größer als die humane *edg6* mRNA.

Material und Methoden

Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen

Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) wurden aus frischen primären Blutzellen (buffy coats) mittels Dichtezentrifugation gewonnen. Zunächst wurden jeweils 10 ml der frischen primären

8 11.09.98

Blutzellen in vier 50 ml Falcon-Röhrchen mit je 20 ml PBS gemischt. Das PBS war mit 5 U/ml Heparin versetzt. Dieses Gemisch wurde mit 10 ml Ficoll-Separationslösung der Firma Biochrom unterschichtet und für 20 min bei 200 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die oberen 20 bis 25 ml des Gemisches entfernt. Der Rest des Gemisches, der immer noch mit Thrombozyten kontaminiert war, wurde anschließend ein weiteres Mal für 20 min bei 460 x g zentrifugiert. Die gebildete Interphase aller Falcon-Röhrchen wurde gesammelt und dreimal für 15 min bei 300 x g mit eiskaltem PBS, versetzt mit 1 mM EDTA, gewaschen, um eine Kontamination mit Thrombozyten weitestgehend zu vermeiden.

Jeweils 5×10^7 periphere mononukleäre Blutzellen wurden zusammen mit 15 ml RPMI-Medium in 3 sterile Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm gegeben und für 2 h im CO₂-Brutschrank bei 37°C kultiviert. Anschließend wurde der Boden der Petrischale einige Male vorsichtig mit dem RPMI-Medium mittels einer Glaspipette von allen Seiten gewaschen, wobei ein Großteil der nichtadhärenten Zellen sich vom Boden ablöste. Die nichtadhärenten Zellen wurden zusammen mit dem Medium verworfen. Danach wurden zu jeder Petrischale 15 ml frisches, auf 37°C vorgewärmtes RPMI-Medium zugegeben, das nun 800 U/ml GM-CSF und 1000 U/ml IL-4 enthielt. Von nun an wurde das Medium drei weitere Male jeden 2. Tag aufgefrischt. Dabei wurden von jeder Petrischale 7,5 ml des Mediums abgenommen und durch neues RPMI-Medium, das nun 1600 U/ml GM-CSF und 1000 U/ml IL-4 enthielt, ersetzt. Am 7. Tag der Zellkultur wurden die Zellen geerntet.

Die Burkitt-Lymphom-Zelllinien BL64 und DG75 sowie die lymphoblastoide T-Zelllinie CEM und die promyelozytische Zelllinie U937 wurden in RPMI1640-Medium mit 10% fötalem Kälberserum kultiviert, die Kehlkopfkrebs-Zelllinie HEp2 und der HEp2-Subklon cl32 sowie die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293 wurden in DMEM-Medium mit 10% fötalem Kälberserum kultiviert.

RNA-Isolierung

Gesamt-RNA wurde mit dem TRIzol-Reagenz der Firma Gibco BRL nach dem mitgelieferten Protokoll präpariert. Die Präparation von mRNA erfolgte mit dem "Micro mRNA Purification Kit" der Firma Pharmacia Biotech anhand der beiliegenden Unterlagen.

Northernblot

Der Transfer der RNA wurde nach der Kapillarblot-Methode durchgeführt, die einen gerichteten Transfer von RNA-Fragmenten durch eine Ionenwanderung ermöglicht. Dabei wurde eine Glasscheibe, die etwa so breit war wie das zu blottende Gel, quer über eine mit 20x SSC-Puffer gefüllte Schale gelegt. Zwei Filterpapiere, die die Länge des zu blottenden Gels hatten und breit genug waren, um, quer über der Glasscheibe liegend, mit beiden überstehenden Enden tief in die mit Puffer gefüllte Schale hineinzuragen, wurden mit 20x SSC-Puffer getränkt und in geschilderter Weise übereinander auf die Glasscheibe gelegt. Darauf wurde paßgenau und luftblasenfrei das RNA-Gel mit der Oberseite nach unten gelegt. In gleicher Weise wurde die Nitrocellulosemembran, die die Größe des Gels hatte und zuvor jeweils 10min in Wasser und anschließend in 20x SSC-Puffer eingelegt wurde, auf das Gel aufgelegt. Da das Gel noch einen beträchtlichen Anteil an Formaldehyd enthielt, wurde der Blot unter dem Abzug aufgebaut. Auf die Nitrocellulosemembran wurde eine wasserundurchlässige Plastikmaske aufgelegt, die die Ränder des Blots um die Membran wasserdicht abschloß. Zwei weitere Filterpapiere in der Größe der Nitrocellulosemembran wurden in 20x SSC-Puffer getränkt und ebenfalls paßgenau und luftblasenfrei aufgelegt. Ein Stapel trockener Papierhandtücher bildete den oberen Abschluß des Aufbaus. Mit einem Gewicht von etwa 0,5 kg beschwert, wurde etwa 2 Tage lang geblottet. Die RNA ist für 2 Stunden bei 80°C fixiert worden.

Für die Hybridisierung wurde ein ³²P markiertes kloniertes humanes oder murines edg6 cDNA-Fragment verwendet. Die Markierungsreaktion wurde mit dem "Random Primed Labeling Kit" der Firma Gibco BRL nach deren Anleitung durchgeführt. Der humane RNA Master Blot der Firma Clontech wurde entsprechend den mitgelieferten Unterlagen hybridisiert und gewaschen.

Polymerase-Kettenreaktion

Ein μg der aus in vitro differenzierten humanen dendritischen Zellen isolierten mRNA wurde revers transkribiert mit der reversen Transkriptase "Superscript" der Firma Gibco BRL in Gegenwart von einem pmol eines 25- bis 30-mer Oligo(dT)-Primers. Die PCR-Amplifizierung mittels Thermoprime Plus DNA Polymerase der Firma Advanced Biotechnologies wurde mit 100 pmol der folgenden Primer durchgeführt: R1 (5'-C-CGG-ATC-CGC-VTD-VTS-GGM-AAY-KBV-YTS-GT-3'), R3 (5'-CG-GGA-TCC-GAA-RGY-RTA-SAD-SAD-RGG-RTT-3'). Zyklus: 94°C, 60 sek.; 48-63°C, 30 sek.; 72°C, 90 sek.; 35 Zyklen. Für die Amplifizierung der 3'- und 5'-Enden der humanen edg6 cDNA wurde eine RACE-PCR durchgeführt mit den folgenden Primern: 5'-hgSPRT (5'-TTG-GAG-CCA-AAG-ACG-TCG-GCC-3'), 5'-hgSP1 (5'-AGG-CAG-AAG-AGG-ATG-TAG-CGC-3'), 5'-hgSP2 (5'-GCG-CTC-CCC-TGC-AGT-GAA-GAG-3'), 3'-hgSP1 (5'-AGT-GAC-CTG-CTC-ACG-GGC-GCG-3'), 3'-hgSP2 (5'-CTC-TTC-ACT-GCA-GGG-GAG-CGC-3'). Die Reaktionen wurden nach dem Protokoll von M.A. Frohman durchgeführt (Frohman, 1995). Die Amplifikation des 5'-Endes der murinen edg6 cDNA wurde ebenfalls mit Hilfe der RACE-PCR durchgeführt mit den folgenden Primern: 5'-mgSPRT (5'-CTC-ACC-TCG-TCT-GGG-AGG-GCC-TGC-3'), 5'-mgSP1 (5'-TGG-GCA-ACT-GGC-TGG-TCC-AAG-CTC-3'), 5'-mgSP2 (5'-GCC-TCG-GGC-CCA-GAT-CCT-CCA-GGG-GTG-CTG-CGG-ACG-CTG-GAA-ATG-CTG-G-3'). Zuvor wurde wie oben bereits beschrieben eine reverse Transkription mit 10 μg gesamt-RNA der murinen Zelllinie 18 durchgeführt. Der 5'-mgSP2-Primer enthält einen Teil der myc-Epitop-Sequenz für weitergehende Experimente. Die Primer wurden anhand der murinen EST-Sequenz des cDNA-Klons val6c04.r1 (GenBank Eintrag Nr. AA254425) ausgewählt, die mit dem 3'-Ende der kodierenden humanen edg6 cDNA eine hohe Homologie aufweist. Die Reaktionen wurden ebenfalls nach dem Protokoll von M.A. Frohman ausgeführt (Frohman, 1995) mit einem zusätzlichen Reinigungsschritt mittels "MicroSpin S-400 HR" Säulen der Firma Pharmacia Biotech anhand des mitgelieferten Protokolls nach der 5'-Polyadenylierungsreaktion. Desweiteren wurden für beide Amplifizierungen der RACE-PCR 10 μl unverdünnte Vorlagen-DNA verwendet. Das murine edg6 cDNA-Fragment, das als radioaktiv

markierte Probe im Northernblot eingesetzt wurde, wurde durch die reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion aus einer gesamt-RNA Präparation der murinen Zelllinie 18 wie oben beschrieben amplifiziert mit je 25 pmol des 3'-Primers (5'-CCA-CGT-CCT-CCT-GCC-CGC-CGC-3') und 25 pmol des 5'-mGSP2-Primers (siehe oben). Zyklus: 94°C, 60 sek.; 50°C, 60 sek.; 72°C, 90 sek.; 35 Zyklen. Die Amplifizierung der genomischen 3'-Sequenz des humanen edg6 wurde mittels PCR aus 400 ng HEp2 genomischer DNA mit 25 pmol des 3'-hGSP2 Primers (siehe oben) und 25 pmol des CA-Primers (5'-CCA-CTT-CCC-GCA-ACG-CCC-AGA-3') durchgeführt. Zyklus: Initiale Denaturierung, 95°C, 5 min.; 95°C, 30 sek.; 60°C, 30 sek.; 72°C, 90 sek.; 30 Zyklen.

Klonierung und Sequenzierung

Die cDNA Fragmente der PCR Reaktionen mit den degenerierten Primern wurden nach Bam HI Verdau in den pZerO-2 Vektor der Firma Invitrogen kloniert. Die humanen edg6 RACE-PCR Produkte wurden nach HIND III/Pst I Verdau in denselben Vektor kloniert. Sie wurden an der Pst I Schnittstelle zu einem Vollängenklon ligiert. Das murine edg6 5'-RACE-PCR Produkt wurde nach HIND III/Eco RV Restriktion in den pZerO-2 Vektor kloniert. Das RACE-PCR Produkt wurde hierzu nach einer T4-Polymerase Reaktion HIND III-verdaut. Das humane cDNA-Fragment für die radioaktive Markierung wurde nach Pst I/Aat II-Restriktion des Vollängenklons (bp 438-842) isoliert. Das amplifizierte murine cDNA-Fragment (bp 328-637) wurde in den Apa I geschnittenen pZerO-2 Vektor kloniert. Dieses Fragment wurde nach radioaktiver Markierung als Sonde in Northernblots eingesetzt. Alle Fragmente wurden mit dem "Thermo Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP" der Firma Amersham International sequenziert und analysiert mit Hilfe des Li-Cor Sequencers der Firma MWG Biotech entsprechend den mitgelieferten Protokollen.

Konstruktion, Expression und FACS-Analyse des myc-Epitop markierten humanen EDG6 Rezeptor

Die Konstruktion des C-terminal myc-Epitop markierten humanen EDG6 Rezeptors sowie dessen Expression in HEK293 Zellen und

B 11.09.98

11

13

seine Analyse mittels Durchflußzytometrie wurde wie beschrieben durchgeführt (Emrich et al., 1993).

Computeranalysen

Sequenzvergleiche, Datenbankrecherchen und statistische Kalkulationen wurden mit Hilfe des HUSAR-Packets V4.0 am Deutschen Krebsforschungsinstitut in Heidelberg sowie mit dem PC-Programm ClustalX V1.62b durchgeführt.

Legende zu den Abbildungen:

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines GPRs in der Zellmembran (nach Emrich, 1995). Die Anordnung der (α - helikalen Transmembrandomänen (I-VII) ist durch Zylinder wiedergegeben. Mögliche Glykosylierungs- (••) und Phosphorylierungsstellen (P) sind ebenso wie eine mögliche Palmitoylierungsstelle (◊) eingezeichnet.

Abbildung 2A: Northernblot mit gesamt-RNA der humanen Burkitt-Lymphom-Zelllinien BL64 und DG75, der promyelozytischen Zelllinie U937 und der lymphoblastoiden T-Zelllinie CEM sowie mit mRNA der Kehlkopfkrebs-Zelllinien HEP2 und cl32, hybridisiert mit einer radioaktiv markierten Sonde der humanen edg6 cDNA. Ethidiumbromid gefärbte rRNA ist als Kontrolle gezeigt.

Abbildung 2B: Humaner RNA Master Blot (Clontech), hybridisiert mit einer radioaktiv markierten Sonde der humanen edg6 cDNA. A1: Hoden; A2: Ovarien; A3: Bauchspeicheldrüse; A4: Hypophyse; A5: Nebenniere; A6: Schilddrüse; A7: Speicheldrüse; A8: Brustdrüse; B1: Niere; B2: Leber; B3: Dünndarm; B4: Milz; B5: Thymus; B6: Periphere Leukozyten; B7: Lymphknoten; B8: Knochenmark; C1: Blinddarm; C2: Lunge; C3: Luftröhre; C4: Placenta; D1: Fötales Gehirn; D2: Fötales Herz; D3: Fötale Niere; D4: Fötale Leber; D5: Fötale Milz; D6: Fötaler Thymus; D7: Fötale Lunge. Keine edg6-spezifischen Hybridisierungssignale wurden von der mRNA der folgenden humanen Gewebe erhalten (nicht abgebildet): Gesamtes Gehirn, Cerebellum, Gehirnrinde, Stirnlappen, Hippocampus, Hirnanhangsdrüse, Occipitallappen, Putamen, Substantia Nigra, Temporallappen, Thalamus, Rückenmark, Herz, Aorta, Skelettmuskel, Dickdarm, Harnblase, Uterus, Prostata, Magen.

Abbildung 2C: Diagramm über die relative Intensität der Dot Blot Signale von ausgewählten Organen.

8 11.09.93

15

Abbildung 2D: Northernblot mit gesamt-RNA muriner Organe, hybridisiert mit einer radioaktiv markierten Sonde der murinen edg6 cDNA. Ly: Lymphknoten; sp: Milz; th: Thymus; lu: Lunge; si: Dünndarm; li: Dickdarm; st: Magen. Kein edg6-spezifisches Hybridisierungssignal wurde von folgenden gesamt-RNA Präparationen muriner Gewebe erhalten (nicht abgebildet): Herz, Leber, Niere, Skelettmuskel, Bauchspeicheldrüse, Cerebellum, Cerebrum.

Patentansprüche

1. Humaner G-Protein gekoppelter Rezeptor EDG6 mit der Sequenz

(Sequenz 1)

sowie seine Fragmente, Varianten und Mutationen.

2. Muriner G-Protein gekoppelter Rezeptor EDG6 mit der Sequenz

(Sequenz 4)

sowie seine Fragmente, Varianten und Mutationen.

3. DNA-Sequenz, die den humanen G-Protein gekoppelten Rezeptor EDG6 sowie seine Fragmente, Varianten und Mutationen kodiert.

4. DNA nach Anspruch 3, gekennzeichnet durch

(Sequenz 2)

5. DNA-Sequenz, die den murinen G-Protein gekoppelten Rezeptor EDG-6 sowie seine Fragmente, Varianten und Mutationen kodiert.

6. DNA nach Anspruch 5, gekennzeichnet durch

(Sequenz 3)

7. Vektoren, die eine DNA-Sequenz ggf. gekoppelt an einen geeigneten Promoter gemäß Anspruch 3-6 enthalten.

8. Wirtszellen, die Vektoren gemäß Anspruch 7 enthalten.
9. Antikörper gegen humane oder murine EDG6 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.
10. Monoklonale Antikörper gemäß Anspruch 9.
11. Testkit zum Nachweis des EDG6-Rezeptors auf der Basis von monoklonalen Antikörpern gemäß Anspruch 10.
12. Testkit zum Nachweis des EDG6-Rezeptors auf der Basis von Nukleinsäurediagnostik.
13. Verwendung des EDG6-Rezeptors sowie seiner Fragmente, Varianten und Mutationen und ggf. seiner Bindungspartner für therapeutische Verfahren und Behandlungen.
14. Verwendung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die therapeutischen Maßnahmen die Funktion von Blut- und Körperzellen beeinflussen, beispielsweise zur Hemmung von akuten und chronischen Entzündungen führen.
15. Verwendung des EDG6-Rezeptors sowie seiner Fragmente, Varianten und Mutationen und ggf. seiner Bindungspartner nach Anspruch 13 - 14, durch die Verwendung für gentherapeutische Verfahren und Behandlungen gekennzeichnet.
16. Verwendung der monoklonalen Antikörper nach Anspruch 10, ggf. gekoppelt an andere Moleküle und Substanzen, beispielsweise Therapeutika, Toxine oder Antikörper, für therapeutische Verfahren und Behandlungen.
17. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die therapeutischen Maßnahmen die Funktion des EDG6-Rezeptors beeinflussen, beispielsweise bei Immun- und Entzündungsreaktionen.

B 11.09.09

29

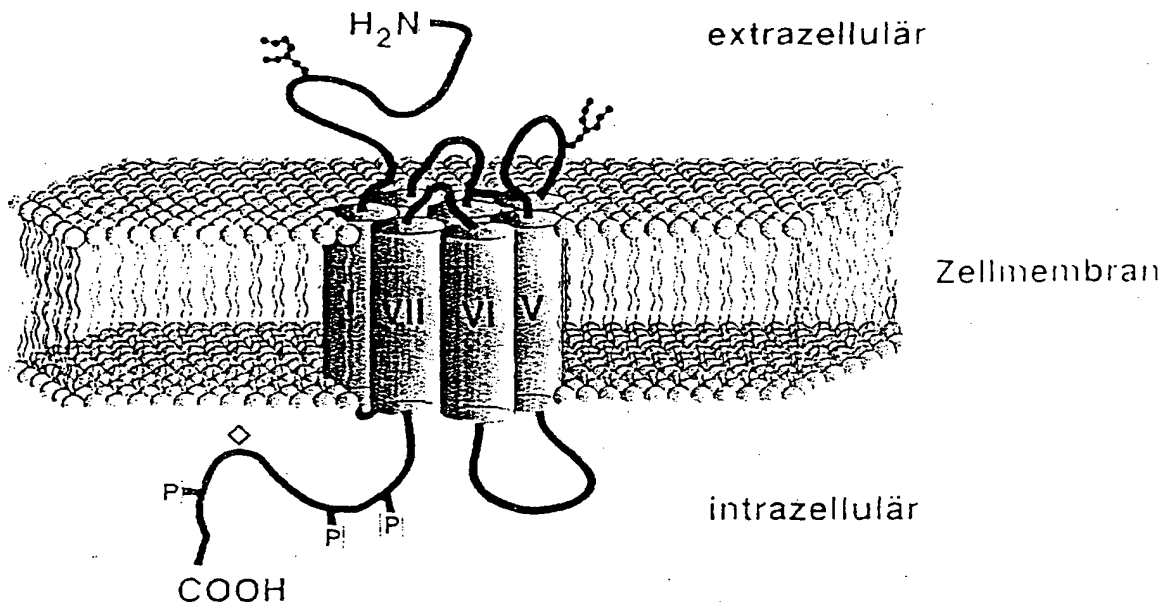
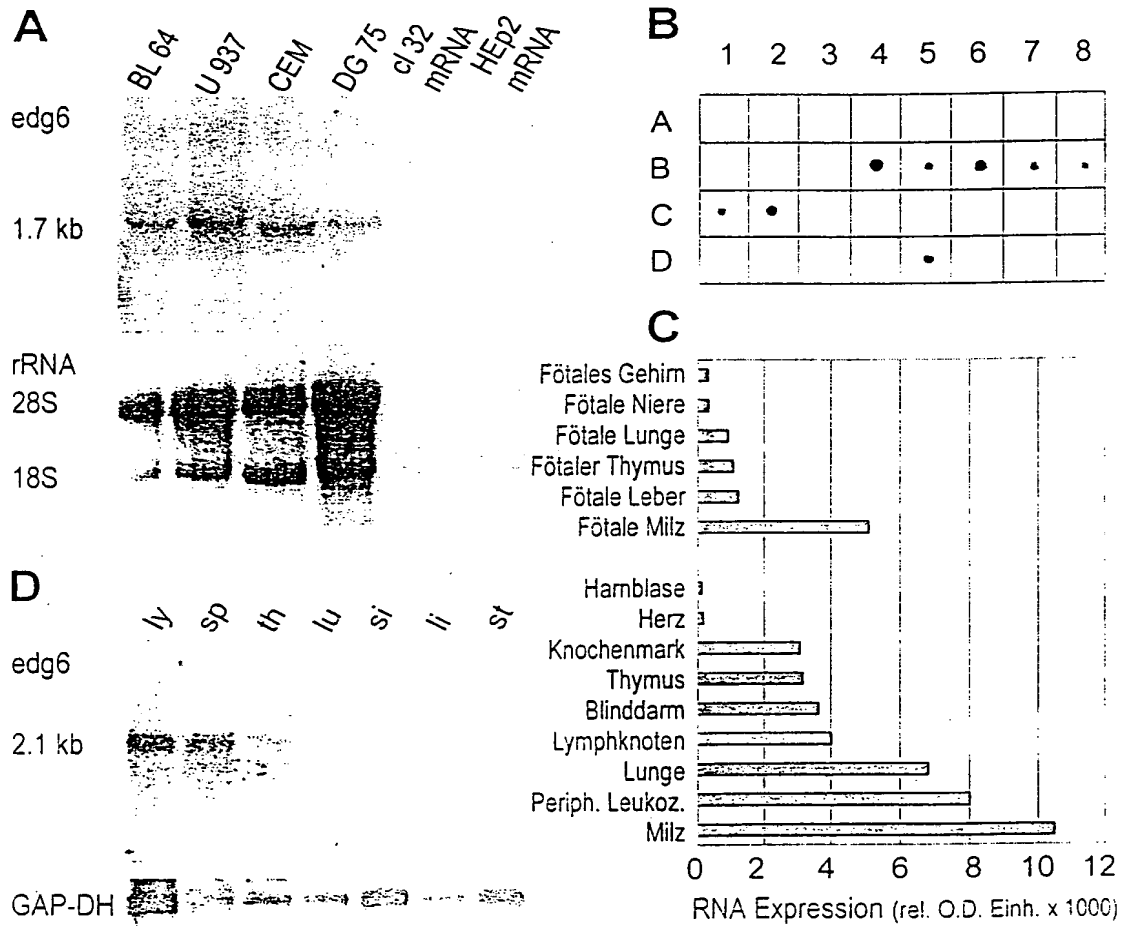


Abbildung 1:

Abbildung 2



B 11.09.88

21

human EDG6 Proteinsequenz
human EDG6 Length: 384 aa

1 MNATGTPVAP ESCQQLAAGG HSRLIVLHYN HSGRLAGRGG PEDGGLGALR
51 GLSVAASCLV VLENLLVLAA ITSHMRSRRW VYYCLVNITL SDLLTGAAYL
101 ANVLLSGART FRLAPAQWFL REGLLFTALA ASTFSLLFTA GERFATMVRP
151 VAESGATKTS RVYGFIGLCW LLAALLGMLP LLGWNCLCAF DRCSLLPLY
201 SKRYILFCLV IFAGVLATIM GLYGAI FRLV QASGQKAPRP AARRKARRLL
251 KTVLMILLAF LVCWGPLFGL LLADVFGSNL WAQEYLRGMD WILALAVLNS
301 AVNPIIYSFR SREVCRAVLS FLCCGCLRLG MRGPGDCLAR AVEAHSGAST
351 TDSSLRPRDS FRGSRSL SFR MREPLSSISS VRSI

Sequenz 1

11099

22

human EDG6 cDNA-Sequenz
human EDG6 Length: 1155 bp

```

1  ATGAACGCCA CGGGGACCCC GGTGGCCCCC GAGTCCTGCC AACAGCTGGC
51  GGCCGGCGGG CACAGCCGGC TCATTGTTCT GCACTACAAC CACTCGGGCC
101 GGCTGGCCGG GCGCGGGGGG CCGGAGGATG GCGGCCTGGG GGCCCTGCGG
151 GGGCTGTCTG TGGCCGCCAG CTGCCTGGTG GTGCTGGAGA ACTTGCTGGT
201 GCTGGCGGCC ATCACCAGCC ACATGCGGTC GCGACGCTGG GTCTACTATT
251 GCCTGGTGAA CATCACGCTG AGTGACCTGC TCACGGGCGC GGCCTACCTG
301 GCCAACGTGC TGCTGTCTGG GGCCCGCACC TTCCGTCTGG CGCCCGCCCA
351 GTGGTTCTTA CGGGAGGGCC TGCTCTTCAC CGCCCTGGCC GCCTCCACCT
401 TCAGCCTGCT CTTCACTGCA GGGGAGCGCT TTGCCACCAT GGTGCGGCCG
451 GTGGCCGAGA GCGGGGCCAC CAAGACCAGC CGCGTCTACG GCTTCATCGG
501 CCTCTGCTGG CTGCTGGCCG CGCTGCTGGG GATGCTGCCT TTGCTGGGCT
551 GGAAGTGCCT GTGCGCCTTT GACCGCTGCT CCAGCCTTCT GCCCCTCTAC
601 TCCAAGCGCT ACATCCTCTT CTGCCTGGTG ATCTTCGCCG GCGTCCTGGC
651 CACCATCATG GGCCTCTATG GGGCCATCTT CCGCCTGGTG CAGGCCAGCG
701 GGCAGAAGGC CCCACGCCCA GCGGCCCGCC GCAAGGCCCG CCGCCTGCTG
751 AAGACGGTGC TGATGATCCT GCTGGCCTTC CTGGTGTGCT GGGGCCCACT
801 CTTGCGGCTG CTGCTGGCCG ACGTCTTTGG CTCCAACCTC TGGGCCCAGG
851 AGTACCTGCG GGGCATGGAC TGGATCCTGG CCCTGGCCGT CCTCAACTCG
901 GCGGTCAACC CCATCATCTA CTCCTTCCGC AGCAGGGAGG TGTGCAGAGC
951 CGTGCTCAGC TTCCTCTGCT GCGGGTGTCT CCGGCTGGGC ATGCGAGGGC
1001 CCGGGGACTG CCTGGCCCGG GCCGTCGAGG CTCACTCCGG AGCTTCCACC
1051 ACCGACAGCT CTCTGAGGCC AAGGGACAGC TTTCGCGGCT CCCGCTCGCT
1101 CAGCTTTCGG ATGCGGGAGC CCCTGTCCAG CATCTCCAGC GTGCGGAGCA
1151 TCTGA

```

Sequenz 2

B 11.09.88

23

murine EDG6 cDNA-Sequenz
murine EDG6 Length: 1161 bp

1 ATGAACATCA GTACCTGGTC CACGCTGGTG ACCCCAGAGT CCTGCCACCG
51 GCTGGCAGCC AGCGGCCACA GCCTCCTCAT TGTCTGCAC TACAATCACA
101 GCGGCAGGCT GGCCAGCCGC GGGGGCTCTG AGGACGGTGG AGGGCTAGGG
151 ATGCTGAGGG GGCCGTCGGT GGCCGCAGGT TGCCTGGTGG TGCTGGAGAA
201 CGCCATGGTG CTGGCCGCCA TCGCCATCTA CATGCGGTCC CGCCGCTGGG
251 TGTACTACTG CCTGCTGAAC ATCACACTGA GTGACCTGCT CACAGGCCTG
301 GCCTACGTGG TCAACGTGCT GCTGTCAGGG ACTCGTACCT TCCAGCTGTC
351 ACCGGTGCAC TGGTTCCTGC GGGAGGGCCT GCTCTTCATG GCCTTGGCCG
401 CATCCACCTT CAGTCTGCTC TTCACGGCCG GCGAGCGCTT CGCCACCATG
451 GTGCGGGTGG CTGAGAGTGG GGCCACCAAG ACCAGCCGTG TGTATGGCTG
501 CATCGGTCTG TGCTGGCTAC TGGCAGCTAT CCTGGGCCTG CTGCCCCTGC
551 TGGGCTGGAA CTGTGTGTGC GCCTTCCCAC GCTGCTCCAG CCTGCTGCCC
601 CTCTACTCCA AGGGCTATGT GCTCTTTTGT GTGGTGGTCT TCGCCCTCAT
651 CCTAGTGGCT ATCCTGAGCC TCTACGGGGC CATCTTTAGA GTGGTCCGAG
701 CCAATGGGCA GAAGTCTCCA CGTCCTCCTG CCCGCCGCAA GTCCCGCAGG
751 CTACTCAACA CCGTGCTGAT GATCTTGGTG GCCTTTGTGG TGTGCTGGGG
801 TCCCCTGTTT GGCCTGCTCC TGGCTGACAT CTTTGGTTCT AATGTCTGGG
851 CCCAGGAGTA CCTGCGTGGC ATGGACTGGA TCCTGGCCCT GGCCGTGTTT
901 AACTCAGCCA TTAATCCTCT CATCTACTCC TTCCGCAGCC GTGAGGTGCA
951 GCGCGCTGTG CTGGCCTTCC TGTGCTGCGG CTGTCTCTGG CTAGGTCTGC
1001 GAGGTCCAGG AGACTGCCTG ACCCGGATCA CCGAGGCCCA CTCCGGTGCA
1051 TCCACCACTG ACAGCTCCCT GAGGCCCAGG GACAGTTTTT GGAATTCTCG
1101 GTCACTCAGC TTCAGGATGA GAGAGCCGCT GTCCAGCATT TCCAGCGTCC
1151 GCAGCACCTA G

Sequenz 3

8 11.09.98

24

murine EDG6 Proteinsequenz
murine EDG6 Length: 386 aa

1 MNISTWSTLV TPESCHRLAA SGHSLILVLH YNHSGRLASR GGSEDGGGLG
51 MLRGPSVAAG CLVVLENAMV LAAIAIYMRS RRWVYYCLLN ITLSDLLTGL
101 AYVVNVLLSG TRTFQLSPVH WFLREGLLFM ALAASTFSLL FTAGERFATM
151 VRVAESGATK TSRVYGCIGL CWLLAAILGL LPLLGWNCVC AFPRCSSLLP
201 LYSKGYVLFC VVVFALILVA ILSLYGAIFR VVRANGQKSP RPPARRKSRR
251 LLNTVLMILV AFVVCWGPLF GLLADIFGS NVWAQEYLRG MDWILALAVF
301 NSAINPLIYS FRSREVQRAV LAFLCCGCLW LGLRGPGDCL TRITEAHSGA
351 STTDSSLRPR DSFRTSRSLs FRMREPLSSI SSVRST

Sequenz 4